

定量的遺伝子発現解析法によるヒトがん細胞株と肺腺癌組織におけるPI3K触媒サブユニット4アイソフォームの発現

著者	中村 啓之
号	77
学位授与番号	2509
URL	http://hdl.handle.net/10097/45718

なか 中 むら 村 ひろ 啓 ゆき 之

博 士 (医 学)

医 博 第 2 5 0 9 号

平成 19 年 9 月 12 日

学位規則第 4 条第 1 項該当

東北大学大学院医学系研究科
(博士課程) 医科学専攻

學位論文題目

Expression analysis of the four isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) catalytic subunit in human cancer cell lines and human lung carcinoma by quantitative gene expression assay method

(定量的遺伝子発現解析法によるヒトがん細胞株と肺腺癌組織における PI3K 触媒サブユニット 4 アイソフォームの発現)

(主 查)

論文審查委員

教授 海野 倫 明 教授 石 岡 千加史

教授 貫 和 敏 博

論文内容要旨

【背景】

Class I Phosphoinositide-3-kinase (PI3K) を介したシグナル伝達は、がんでしばしば脱制御し、その上流因子 (*EGFR*, *RAS* 等), 下流因子 (*AKT/PKB* 等), または抑制因子 (*PTEN*) にがんを高頻度に gene alteration を認めるため、がん化・がんの形質維持・悪性化等に重要な役割を担うと考えられ、この経路の阻害はがん治療の有望な標的とされている。Class I PI3K は細胞内で調節・触媒サブユニットのヘテロダイマーを形成し、両サブユニットは各々複数の遺伝子 (調節: 3 種, 触媒: *PIK3CA*, *-B*, *-D*, *-G*)・遺伝子産物 (調節: 5 種, 触媒: $p110\alpha$, $-\beta$, $-\delta$, $-\gamma$) から成る。調節サブユニットは触媒サブユニットの安定化・活性制御に関わるが、触媒サブユニットとの結合嗜好性は知られていない。一方、触媒サブユニットの 4 アイソフォームについては、マウスジーンターゲット法および近年開発が進んでいるアイソフォーム特異的阻害物質を用いた研究により、その組織分布・機能の特異性が解明されてきた。また、*PIK3CA* の機能亢進性変異が多様ながんで高頻度に生じている事が多数報告されている。近年 class I PI3K 触媒サブユニット 4 アイソフォームのがんにおける役割が注目されているが、*PIK3CA* の変異以外の情報はほとんどない。

【目的】

本研究では、がんでの各アイソフォームの発現量に着目し、(1) アイソフォーム特異的な発現定量系の確立、(2) 確立した系での各アイソフォームの発現検討 (*in vitro*, *in vivo*) を目指す。

【方法】

Class I PI3K 触媒サブユニット 4 アイソフォームをクローニングした。得られた濃度既知プラスミド DNA 溶液の希釈系列を作成し、アイソフォーム特異的な蛍光標識リニアプローブ・プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により検量線を作成した。発現量未知のヒトがん細胞株 39 種・ヒト原発性肺がん 30 例について、リアルタイム PCR 法・回帰分析により各アイソフォームの発現を定量した。*PIK3CD* について、リアルタイム PCR 法とは異なる特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法により、ヒトがん細胞株 12 種でその発現を検討した。発現陽性 8 株の PCR 産物の塩基配列をダイターミネーター法で確認した。

【結果・考察】

I. 発現の絶対定量系の確立

検量線の相関係数 (Pearson) を算出し、信頼性を確認した ($R>0.96$)。ヒトがん細胞株 39 種

における各アイソフォームの定量結果につき、2回の実験結果の相関係数 (Pearson)・P 値を算出し、再現性を確認した ($R>0.85$, $P<0.01$)。各アイソフォームに対する PCR の特異性をリアルタイム PCR 反応産物のアガロースゲル電気泳動で (理論的位置に単一バンドを認める事で) 確認した。

II. ヒトがん細胞株 39 種におけるハウスキーピング遺伝子 (*ACTB*・*GAPDH*) の発現検討

最大発現差 15 倍の異なる発現パターンを得た。これらを内部標準として用いず、1 反応あたりの total RNA 量を統一 (50 ng) し、標準化とした。従って絶対定量により、総和としての class I PI3K の発現量の検討も可能となった。

III. ヒトがん細胞株 39 種における各アイソフォームの発現検討

PIK3CA, -*B* の発現を全株で認めた。血球系に主に発現するとされる *PIK3CD*, -*G* のうち、*PIK3CD* の (異所性) 発現を全株 (外胚葉由来) で認めた。*PIK3CG* の発現は、14 株でのみ認めた。各アイソフォームの発現パターンに有意な相関を認めず (最大発現差: *PIK3CA*, 10 倍; -*B*, 5 倍; -*D*, 1,000 倍)。

IV. ヒトがん細胞株 12 種における *PIK3CD* の発現検討

リアルタイム PCR の結果より *PIK3CD* 高・中・低発現株を各々 4 種選び、半定量的 RT-PCR を行い、リアルタイム PCR と同様の結果を得た。高・中・発現株 8 種の PCR 産物の塩基配列を確認し、*PIK3CD* の異所性発現を確認した。

V. ヒト原発性肺癌 30 例の癌組織における各アイソフォームの発現検討

PIK3CA, -*B* の発現を全例で認めた。また、*PIK3CD*, -*G* の発現を全例で認めた。各アイソフォームの発現パターンに有意な相関を認めず (最大発現差: *PIK3CA*, 500 倍; -*B*, 10 倍; -*D*, 40 倍; -*G*, 200 倍)。肺癌細胞において *PIK3CD* の異所性発現が生じている可能性が示唆されたが、これを立証するには凍結組織中の血球系細胞混入による影響を否定する必要があると考えられた。

【結 語】

- (1) Class I PI3K 触媒サブユニット 4 アイソフォームにつき、アイソフォーム特異的な発現の絶対定量系を確立した。
- (2) 各アイソフォームの発現に細胞株毎・症例毎の個性を認めた。
- (3) 正常では血球系以外にほとんど発現しないとされる *PIK3CD* の発現を、検討した全てのヒトがん細胞株 (39 種) で認めた。

審 査 結 果 の 要 旨

Class I Phosphoinositide-3-kinase (PI3K) を介したシグナル伝達は、がんでしばしば脱制御し、その上流因子 (*EGFR*, *RAS* 等), 下流因子 (*AKT/PKB* 等), または抑制因子 (*PTEN*) にがんで高頻度に gene alteration を認めるため、がん化・がんの形質維持・悪性化等に重要な役割を担うと考えられ、この経路の阻害はがん治療の有望な標的とされている。Class I PI3K は細胞内で調節・触媒サブユニットのヘテロダイマーを形成し、両サブユニットは各々複数の遺伝子 (調節: 3 種, 触媒: *PIK3CA*, *-B*, *-D*, *-G*)・遺伝子産物 (調節: 5 種, 触媒: $p110\alpha$, $-\beta$, $-\delta$, $-\gamma$) から成る。調節サブユニットは触媒サブユニットの安定化・活性制御に関わるが、触媒サブユニットとの結合嗜好性は知られていない。一方、触媒サブユニットの 4 アイソフォームについては、マウスジーンターゲット法および近年開発が進んでいるアイソフォーム特異的阻害物質を用いた研究により、その組織分布・機能の特異性が解明されてきた。また、*PIK3CA* の機能亢進性変異が多様ながんで高頻度に生じている事が多数報告されている。近年 class I PI3K 触媒サブユニット 4 アイソフォームのがんにおける役割が注目されているが、*PIK3CA* の変異以外の情報はほとんどない。

本論文ではがんでの各アイソフォームの発現量に着目し、(1) リアルタイム PCR 法を用いたアイソフォーム特異的な発現の絶対定量系の確立し、(2) 確立した系での各アイソフォームの発現検討 (*in vitro*, *in vivo*) を行っている。ヒトがん細胞株 39 種・ヒト原発性肺癌 30 例について検討を行い、各アイソフォームの発現量には *in vitro*, *in vivo* 共に個性がある事が確認された。また、4 アイソフォーム中でその発現が血球系に 'predominant' とされる *PIK3CD*・*PIK3CG* について、上皮系由来のがん細胞株 (*PIK3CD*: 全株, *PIK3CG*: 14 株)・肺癌組織 (*PIK3CD*・*PIK3CG* 共に全例) 双方で発現が確認された。特に *in vitro*, *in vivo* 双方で全例に発現が確認された *PIK3CD* については、発現定量系とは異なる特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法によりヒトがん細胞株 12 種でその発現を検討し、発現陽性 8 株については更に PCR 産物の塩基配列をダイターミネーター法で確認している。*PIK3CD* が「癌腫」治療に対して新規分子標的となりうる可能性を示しており、今後の展開が期待される研究分野と言える。

以上のように、本論文は新規知見に富み、その論旨も論理的・科学的であり、東北大学大学院医学博士の学位論文として値するものである。